

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620101152431

UDC _____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

一种新的维甲酸受体特异性激动剂的 发现与功能研究

Revealing a natural marine product as a novel agonist for
retinoic acid receptors with inhibitory effects on cancer cells

王姗姗

指导教师姓名: 李 勇 教 授

专 业 名 称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2013 年 05 月

论文答辩时间: 2013 年 06 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(李勇)课题(组)的研究成果,获得(李勇)课题(组)经费或实验室的资助,在(李勇)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	I
1. 前言.....	1
1.1 核受体简介.....	1
1.1.1 核受体的分类与命名.....	1
1.1.2 核受体的功能与结构.....	2
1.2 维甲酸受体研究进展.....	4
1.2.1 维甲酸受体的结构.....	5
1.2.2 维甲酸受体的转录激活机制.....	6
1.2.3 维甲酸受体的功能研究进展.....	8
1.3 Luffariellolide	11
1.3.1 Luffariellolide 简介	11
1.3.2 Luffariellolide 与维甲类化合物的比较	12
1.4 本研究的目的与意义.....	13
2. 材料与方法	14
2.1 常用药品、试剂与耗材.....	14
2.2 细胞培养.....	15
2.2.1 细胞株.....	15
2.2.2 细胞常规培养.....	15
2.3 分子克隆相关方法.....	16
2.3.1 质粒与载体.....	16
2.3.2 质粒构建.....	18
2.4 目的蛋白的表达与纯化.....	21
2.4.1 RAR α LBD 蛋白表达	21
2.4.2 RAR α LBD 蛋白纯化	22
2.4.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	23
2.5 辅因子结合实验.....	23
2.6 瞬时转染实验.....	24

2.7 MTT 法检测 Luffariellolide 抑制细胞增殖活性.....	25
2.8 应用流式细胞术检测 Luffariellolide 对细胞周期的影响.....	26
2.9 RT-PCR 法检测基因表达水平的变化	27
2.9.1 细胞总 RNA 的提取	27
2.9.2 RNA 反转录生成 cDNA.....	27
2.9.3 荧光定量 PCR 检测	28
2.10 数据统计与分析.....	28
3. 结果与讨论	29
3.1 实验结果.....	29
3.1.1 RAR α 特异性激动剂 Luffariellolide 的发现.....	29
3.1.2 Luffariellolide 是泛维甲酸受体激动剂	32
3.1.3 Luffariellolide 抑制癌细胞的增殖活性	34
3.1.4 Luffariellolide 对癌细胞细胞周期的影响	37
3.1.5 Luffariellolide 对癌细胞基因表达的调控	40
3.1.6 Luffariellolide 对具有维甲酸耐药性的结直肠癌细胞的作用	41
3.2 总结与讨论.....	44
参考文献	45
致谢.....	50

CONTENTS

ABSTRACT(IN CHINESE)	I
ABSTRACT(IN ENGLISH)	II
1. Introduction.....	1
1.1 Nuclear Receptors	1
1.1.1 Classification and Nomenclature of Nuclear Receptors	1
1.1.2 Function and Structure of Nuclear Receptors	2
1.2 Research Progress of Retinoic Acid Receptors.....	4
1.2.1 Structure of Retinoic Acid Receptors	5
1.2.2 Transcriptional Activation Mechanism of Retinoic Acid Receptors.....	6
1.2.3 Advance in Retinoic Acid Receptors	8
1.3 Luffariellolide	11
1.3.1 Introduction of Luffariellolide	11
1.3.2 Comparison between Luffariellolide and Retinoids	12
1.4 The Objective and Prospective	13
2. Materials and Methods.....	14
2.1 Chemicals and Reagents.....	14
2.2 Cell Culture	15
2.2.1 Cell Lines	15
2.2.2 Regular Cell Culture	15
2.3 Methods of Molecular Cloning	16
2.3.1 Plasmids and Vectors	16
2.3.2 Plasmid Construction	18
2.4 Protein Expression and Purification	21
2.4.1 Expression of RAR α LBD	21
2.4.2 Purification of RAR α LBD	22
2.4.3 SDS-PAGE.....	23
2.5 Cofactor Binding Assays.....	23

2.6 Transient Transfection and Reporter Assays.....	24
2.7 MTT Assays	25
2.8 Cell Cycle Assessed by Flow Cytometry	26
2.9 RNA Analysis by RT-PCR	27
2.9.1 Extraction of total RNA	27
2.9.2 RNA Reverse Transcription	27
2.9.3 Quantitative PCR with Fluorescence	28
2.10 Data Collection and Analysis	28
3. Results and Discussion.....	29
3.1 Results	29
3.1.1 Identification of Luffariellolide as an Agonist of RAR α	29
3.1.2 Luffariellolide as a Pan-RAR Agonist	32
3.1.3 Inhibition of Cancer Cell Proliferation	34
3.1.4 Effect on Cancer Cell Cycle.....	37
3.1.5 Regulation of RAR Target Genes	40
3.1.6 Effect on ATRA-resistant Cancer Cells	41
3.2 Discussion.....	44
References	45
Aknowlegements	50

摘 要

维甲酸类化合物对细胞的增殖与分化具有重要的调节作用，主要通过激活维甲酸受体（RARs, RAR α , β , γ ）或维甲类 X 受体（RXRs, RXR α , β , γ ）发挥作用。这些小分子配体与受体结合后，维甲酸受体与维甲类 X 受体就会以异源二聚体的形式募集辅因子从而调控下游靶基因。维甲酸受体配体所具有的减缓或抑制细胞增殖的作用已经广泛应用于多种癌症的治疗中，例如急性早幼粒白血病等。但是过于强烈的副作用会限制维甲酸类维甲酸受体配体的临床应用，而且维甲酸的临床使用还受到细胞抗药性的影响。因此，改变针对维甲酸受体配体的药物研发策略，研制不同于维甲酸类化合物的维甲酸受体配体，可能会降低基于维甲酸受体配体的药物的副作用。

本文通过对化合物库进行筛选发现海洋天然产物 Luffariellolide 是一种新型的维甲酸受体激动剂，并且阐述了这种配体特异性识别维甲酸受体的分子机理。Luffariellolide 化学本质为二倍半萜，与全反式维甲酸类似，由一条疏水的碳链和一个三甲基环己烯基团组成。但是关键位置的基团两者完全不同。全反式维甲酸为丁烯酸（羧基），而在 Luffariellolide 的相应位置上则为 γ -羟基丁烯酸内酯环。这个区别是极其重要的，是药物研发新策略的关键所在。虽然与已知的维甲酸类配体的结构不同，但 Luffariellolide 既可促进辅激活因子与维甲酸受体的结合，又可以调控维甲酸受体的靶基因表达。我们又进一步通过细胞生物学实验发现 Luffariellolide 能够通过维甲酸受体抑制多种肿瘤细胞的生长，而且能够抑制对维甲酸有耐药性的结肠癌细胞的增殖。因此，本研究表明该类海洋天然产物能够提供一种设计策略以研发用于抑制肿瘤生长并且有效改善耐药性的药物，对与维甲酸受体相关疾病的治疗具有重要意义。

关键词：Luffariellolid；维甲酸受体；核受体；癌症。

ABSTRACT

Retinoids and its natural or synthetic derivatives are important regulators of cell proliferation and differentiation in a diverse array of tissues. These small molecules exert their effects by activating retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs), which act as ligand-dependent transcription factors. The RARs form heterodimers with the RXRs and recruit a variety of nuclear receptor co-regulators to regulate downstream target genes in response to various ligands. RAR ligands slow or arrest the growth of many transformed cell lines and have been used as therapeutic agents for various cancers, such as acute promyelocytic leukemia (APL). Unfortunately, adverse side effects limit further development and clinical application of retinoids and retinoid-based RAR ligands. RA-based chemotherapy is further hampered by the development of RA resistance, which arises in a variety of cancer cells. Consequently, a new drug design strategy for RAR ligands distinct from retinoids may yield more efficacious RAR-targeted drugs with less adverse effects.

To search for novel ligands that activate RARs, we screened chemical libraries based on the Alpha screen biochemical assay. The results revealed luffariellolide as a positive RAR α activator. The marine natural product luffariellolide is a sesterterpene that was found in sponges of both *Luffariella* sp. and *Fascaplysinopsis*. The chemical structure of luffariellolide shows a unique γ -hydroxybutenolide ring terminus instead of a carboxylic acid moiety of retinoids. Luffariellolide showed agonist property on RAR α by selectively inducing its transcriptional activity. Moreover, luffariellolide also activated the transcriptional activity of RAR β and RAR γ , suggesting luffariellolide as a pan-RAR agonist. To further assess the roles of luffariellolide in the physiological function of RARs, we studied the effects of luffariellolide on the growth of different kinds of cancer cell lines. Similar to ATRA, luffariellolide

inhibited the growth of cancer cells and also increased the population of cells in G1 phase. One big challenge that limits the use of RAR ligands for cancer therapy is the development of RA resistance in various types of cancer cell lines. We next investigated the ability of luffariellolide to inhibit cell growth on RA-resistant colon cancer cell line HCT 116. Surprisingly, the growth of HCT 116 cells was substantially inhibited by the treatment of luffariellolide, but not ATRA, suggesting a potential advantage of luffariellolide over ATRA in treating cancer cells.

In summary, we reported here the identification of a natural marine product that activates RARs with a unique antiproliferative activity. Luffariellolide represents a novel scaffold for RAR ligands characterized by a γ -hydroxybutenolide ring terminus compared to a carboxylic acid for retinoids. The unique characteristics of the γ -hydroxybutenolide ring may represent a new pharmacophore that can be optimized for selectively targeting RARs. More importantly, this natural RAR agonist also showed activity in RA-resistant cancer cells. Taken together, the identification of luffariellolide as a novel RAR agonist may provide an alternative drug design strategy for non-retinoid compounds with advantages over current retinoic acid drugs.

Key words: Luffariellolide; Retinoic acid receptor (RAR); Nuclear receptor; Cancer.

前言

1.1 核受体简介

核受体是一类在生物体内广泛存在的转录因子，其成员众多，通常被称为核受体超家族（Nuclear Receptor Superfamily），在机体的生长发育、稳态维持与新陈代谢等方面发挥着重要的作用^[1, 2]。一旦发生异常可导致增殖，再生及代谢等方面的疾病，如癌症、肥胖及糖尿病等^[3]。自二十世纪六十年代 Elwood Jensen 等人运用生化技术发现雌激素受体（Estrogen Receptors, ERs）以来，核受体领域的研究迅猛发展，我们对于核受体的结构，功能及转录调控机制等方面都有了深入的了解与认识^[4]。

1.1.1 核受体的分类与命名

系统发育学（Phylogeny）的研究表明核受体在早期后生动物（Metazoan）的进化中出现，是一类古老的受体家族^[5-7]。目前通过全基因组测序发现，人类共有 48 种核受体，如表 1-1 所示，主要分为经典核受体（Classic Nuclear Receptor），被领养的孤儿核受体（Adopted Orphan Receptor）与孤儿核受体（Orphan Nuclear Receptor）。经典核受体例如雄激素受体（Androgen Receptor, AR）、雌激素受体和维甲酸受体（Retinoic Acid Receptors, RARs）等，因其内源性配体发现较早，而且涉及很多重要的生理活动，所以针对它们的研究已经非常深入而且广泛。目前经典核受体已经成为药物研发中重要的分子靶标，并且已有多例成功典范。孤儿核受体，顾名思义是指那些尚未发现配体的核受体，例如神经生长诱导因子 B（Nerve Growth Factor-induced Gene B, NGFI-B）。随着研究的逐步深入，部分孤儿核受体的配体被发现或者由人工合成。对于这样的核受体我们形象地称之为被领养的孤儿核受体，例如过氧化物酶体增植物激活受体（Peroxisome Proliferator Activated Receptors, PPARs）。

表 1-1 核受体的分类^[8]

Table 1-1 Classification of nuclear receptors^[8]

经典核受体	“被领养的”孤儿核受体	孤儿核受体
AR	CAR	COUP-TF (I, II, III)
ER (α, β)	ERR (α, β, γ)	DAX
GR	FXR	GCNF
MR	HNF4 (α, γ)	LRH
PR	LXR (α, β)	NGFI-B(α, β, γ)
RAR	PPAR (α, β, γ)	PNR
(α, β, γ)	PXR	RevErbA
TR (α, β)	ROR (α, β, γ)	SF1
VDR	RXR (α, β, γ)	SHP
		TLX
		TR2, TR4

事实上这种分类方法是依据习惯而来，而并非严格意义上的系统分类法。随着核受体研究的深入发展其弊端日益凸显。因此，1999 年核受体系统命名委员会以核受体的 DNA 结合域（DNA Binding Domain, DBD）和配体结构域（Ligand Binding Domain, LBD）的同源性为依据，对核受体进行了系统分类，规范了核受体的命名。通过“A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily”规定：核受体以 NRxyz 来命名，NR 代表核受体，x 代表核受体的亚家族，y 代表亚家族中的组别，z 代表的是组别中的成员，其中 x、z 用阿拉伯数字表示，y 用英文字母表示。以维甲酸受体为例，其三个亚型分别表示为：NR1B1（RAR α ）、NR1B2（RAR β ）和 NR1B3（RAR γ ）。

1.1.2 核受体的结构与功能

结构与功能总是相互适应的，核受体的结构也是与其调控基因转录活性的功能相适应的。像其它转录调控因子一样，核受体也拥有其独立的功能域。大多数情况下，这些功能域在相关的核受体之间置换，其功能作用几乎不受影响。核受体超家族成员的基本结构在进化上具有较高的保守性。典型结构如图 1-1 所示，从 N 端到 C 端依据结构域和功能依次分为 A/B 区域，C 区域，D 区域，E 区域和 F 区域。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库